

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 200426099

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕士学位论文

栖热菌属菌株 *Thermus thermophilus* XM 中  
耐热碱性磷酸酶的克隆、表达以及重组酶的  
性质研究

Cloning、expression and characterization of a thermostable  
alkaline phosphatase from *Thermus thermophilus* XM

李建波

指导教师姓名: 杨丰 教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2007年6月10日

论文答辩日期: 2007年7月30日

学位授予日期: 2007年 月 日

答辩委员会主席: 邵宗泽

评阅人: \_\_\_\_\_

2007年7月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。  
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 ( ), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ( )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

目录

中文摘要	1
英文摘要	2
1 前言	5
1.1 嗜热菌的研究进展	5
1.1.1 嗜热菌的分类	5
1.1.2 嗜热菌的生境	6
1.1.3 嗜热菌的分类鉴定极其在生命起源中的地位	6
1.1.4 嗜热菌的耐热机制及嗜热菌的应用	8
1.1.5 栖热菌属 ( <i>Thermus</i> ) 嗜热菌的研究现状	10
1.2 热稳定酶的研究进展	11
1.2.1 热稳定酶的来源	12
1.2.2 热稳定酶的耐热机制及热稳定酶耐热性的改造技术	12
1.2.3 热稳定酶的特性和应用	14
1.2.4 碱性磷酸酶的研究	16
1.2.5 耐热碱性磷酸酶的研究	21
1.3 本研究的目的是和意义	25
2 材料和方法	26
2.1 材料和用具	26
2.2 常用溶液、培养基的配制	27
2.3 方法	32
3 结果和分析	40
3.1 克隆及鉴定	40
3.2 测序结果和序列比对	41
3.3 重组质粒的表达、纯化	43
3.4 重组蛋白的性质	44
4 讨论	49

5 结论与展望	51
5.1 结论	51
5.2 展望	51
参考文献	52
附录	61
附录 I 缩略词	61
附录 II 攻读硕士期间待发表的论文和申请的专利	62
致谢	63

## Contents

<b>Chinese abstract</b>	1
<b>English abstract</b>	2
<b>1 Introduction</b>	5
<b>1.1 Summary of thermophiles</b>	5
1.1.1 Classification of thermophiles	5
1.1.2 Habitation of thermophiles	6
1.1.3 Status of thermophiles	6
1.1.4 Thermostable mechanism of thermophiles	8
1.1.5 Summary of <i>Thermus</i>	10
<b>1.2 Summary of thermostable enzyme</b>	11
1.2.1 Source of thermostable enzyme	12
1.2.2 Thermostable mechanism of thermostable enzyme	12
1.2.3 Characterization and application of thermostable enzyme	14
1.2.4 Summary of alkaline phosphatase	16
1.2.5 Summary of thermostable alkaline phosphatase	21
<b>1.3 Purpose and significance of this thesis</b>	25
<b>2 Materials and methods</b>	26
2.1 Materials	26
2.2 Preparation of common used solution and medium	27
2.3 Methods	32
<b>3 Results and discussion</b>	40
3.1 Cloning and construction of recombinant plasmid	40
3.2 Sequence analysis of $\tau_{ap}$	41
3.3 Expression and purification of the recombinant protein	43
3.4 Characterization of recombinant protein	44
<b>4 Discussion</b>	49

<b>5 Conclusions and prospects</b> -----	51
5.1 Conclusions -----	51
5.2 Prospects -----	51
<b>Refereneces</b> -----	52
<b>Appendix</b> -----	61
<b>Appendix I Abbreviation</b> -----	61
<b>Appendix II Publications and patents</b> -----	62
<b>Acknowledge</b> -----	63

## 栖热菌属菌株 *Thermus thermophilus* XM 中耐热碱性磷酸酶的克隆、表达以及重组酶的性质研究

### 摘要

海洋是人类最后一块没有开发的疆域,海洋中的各种资源吸引着越来越多的科学工作者。海洋生物资源研究更是吸引着世界各国生物学家的注意。嗜热的微生物是海洋生物中一个重要的成员,对它们的研究已经成为国际热点。有证据表明嗜热菌是地球上形成的第一类生命形式,对他们的研究有重要的科学意义,同时对它们产生的各种酶的研究也具有各种工业和科学研究方面的意义。

本研究利用基因工程方法对分离到的栖热菌属的一菌株 *Thermus thermophilus* XM 的碱性磷酸酶进行了克隆、表达,对可溶的重组蛋白进行了 Ni 柱纯化。同时,对重组酶 (rTAPase) 的一些基本的酶学性质进行了测定。

实验表明 *Thermus thermophilus* XM 的 AP 基因的编码序列由 1506bp 组成,编码一个 501 个氨基酸残基的多肽,其分子量为 54.7KDa, N 端有一个 27 个氨基酸残基的信号肽。推测出的氨基酸一级结构与同属的其他菌株的 AP 具有高度保守性,与一些典型的中温 AP 和其它属的 AP 的对比表明,在这些 AP 中,它们的活性位点和金属结合位点具有高度保守性。该基因以 N 端加上一个 6-His 的形式在大肠杆菌中进行了表达。纯化得到的可溶重组蛋白的浓度为 154mg/ml。对 rTAPase 的性质测定结果表明,该重组酶是一个高度耐碱的(最适反应 pH12.0)、中度耐热的(最适反应温度在 75-80℃ 范围内)在 AP。其在 80℃ 保温 6 小时后,活性仍然保留 50% 以上。作为一种金属酶,一些二价金属离子如  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  等对 rTAPase 活性有促进作用,而另外一些金属离子如  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{K}^{+}$  等对 rTAPase 活性有不同程度的抑制作用。两种表面活性剂 SDS 和 Triton X-100 对 rTAPase 具有强烈的抑制作用。在最适反应条件下, rTAPase 催化水解对硝基苯磷酸二钠盐水解的  $K_m$  值为 0.034mM, 着和其他的一些中温和高温的 AP 基本相同,表明 rTAPase 和其它来源的 AP 具有相近的催化能力。

嗜热细菌是耐热酶的主要来源,但是它们培养条件苛刻,不能大量培养,且天然酶的产量低。但是在中温酶中生产耐热酶就不会有以上问题。本研究描述了在中文菌中表达耐热 AP 的过程并且对重组酶性质进行了测定,为该酶的生产 and



应用奠定了基础

**关键词：**耐热碱性磷酸酶； *Thermus thermophilus* XM；酶性质

厦门大学博硕士论文摘要库

## **Cloning、 expression and characterization of a thermostable alkaline phosphatase from *Thermus thermophilus* XM**

### **Abstract**

Alkaline phosphatase (AP) is a kind of hydrolase, which can catalyze the hydrolysis of monophosphoester to produce phosphate or transfer phosphate. AP exists widely in microbial and animal kingdom, but hasn't been found in advanced frond. AP plays a vital important role in phosphate cycle of world creatures, and has been used widely in the fields of diagnostics, biochemistry and molecular biology. The commercial alkaline phosphatases are CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) and *E. coli* AP, which have high specific activity and have been studied intensively. These two kinds of enzymes are only fit for using at room temperature and easy to loss activity at a relatively high temperature. Thermostable alkaline phosphatase (TAP) is one kind of alkaline phosphatase, which has the same catalysis but can keep stable at high temperature. This kind of enzyme has been isolated from the mophile bacteria, and its applications are much more widely than CIAP and *E. coli* AP.

In this study, a thermostable alkaline phosphatase gene (*tap*) from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* XM (*T. thermophilus* XM) was cloned and sequenced. It has 1506 bp and encodes a 501 amino acid polypeptide with a calculated molecular mass of 54.7 kDa. The deduced amino acid sequence exhibited 99.6% similarity to that from *T. thermophilus* HB27 and revealed remarkable conservation of the regions in the vicinity of the corresponding phosphorylation site and metal binding sites in comparison with APase from *Escherichia coli* (*E. coli*). The recombinant thermostable alkaline phosphatase (rTAPase) was expressed as a 6His-tagged fusion protein in *E. coli* and its enzymatic properties were characterized. The pH and temperature optima for activity of the purified enzyme were found to be 12.0 and 75 °C, respectively. As expected, the rTAPase displayed high thermostability,

retaining more than 50 % of activity after six hours incubation at 80 °C. The catalytic activity was enhanced in the presence of  $Mg^{2+}$  but inhibited by  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ . Under optimal conditions, the Michaelis constant ( $K_m$ ) for cleavage of p-nitrophenyl-phosphate (pNPP) was 0.034 mM.

Thermophiles are good candidates in producing thermostable enzyme. However, it is often impractical to use them directly due to the low yield of the enzyme and its rigorous developing conditions. Under this condition, a molecular approach through expression of foreign protein in prokaryotic systems has become a good alternative to economically obtain bulk production of enzyme.

In this study, we cloned a tap gene from *T. thermophilus* XM and expressed it in *E. coli*, discussed the characteristics of the deduced primary structure of the protein, purified and provided a preliminary characterization of the recombinant TAP (rTAPase).

**Key words:** alkaline phosphatase; thermostability, *Thermus thermophilus* XM

## 1 前言

自荷兰人列文虎克于 1976 年用自制的显微镜第一次观察到细菌开始，一个新的微生物世界就展现在我们面前。微生物最主要的特点是：体积小、种类多、繁殖迅速、适应能力强。它们遍及地球上每一个角落，是地球生物圈的基础，是自然界生态平衡和物质循环不可或缺的重要成员，与人类及其生存环境密切相关，是地球生物多样性最为丰富的资源。对微生物的研究具有极其重大的意义。

在自然界中存在着许多不利于生命体存活的条件，如高温、高压、强酸、强碱、高盐、高辐射等。然而，有些微生物可以顽强的在这种环境下存在下去，我们将这些微生物称为极端环境微生物或者简称为极端微生物。极端微生物蕴涵着生命进化历程的丰富信息，代表着生命对于环境的极限适应能力，是生物遗传和功能多样性的宝库，也是人类认识生命本质的重要途径。嗜热微生物是极端微生物的一种，是地球留给人类独特的生物资源和珍贵的科研材料。开展嗜热微生物的研究，对于揭示生物圈起源的奥秘，阐明生物多样性形成的机制，认识生命的极限及其与环境的相互作用的规律等，都具有及其重要的科学意义。嗜热微生物中发现的适应机制，还将为人类在太空中寻找地外生命的理论依据，嗜热微生物的研究成果，将大大促进微生物在能源开发、环境保护、人类健康和生物技术等领域的应用。

### 1.1 嗜热菌的研究进展

#### 1.1.1 嗜热菌的分类

嗜热菌 (Thermophiles) 俗称高温菌，是指最适生长温度在 45℃ 以上的微生物，包括部分细菌、古细菌和真菌三大类，其中真菌较为少见。根据嗜热菌耐热程度的不同又可以分为五个类群：耐热菌、兼性嗜热菌、专性嗜热菌、极端嗜热菌、超嗜热菌。耐热菌最高生长温度在 45-55℃ 之间，低于 30℃ 也能生长；兼性嗜热菌最高生长温度在 50-65℃ 之间；专性嗜热菌最适宜生长温度在 65-70℃ 之间，不能在低于 40-42℃ 条件下生长；极端嗜热菌最适宜生长温度高于 65℃；超嗜热菌最适宜生长温度高于 80℃，有些超嗜热菌在高于 100℃ 的环境下也能旺盛生长<sup>[1-2]</sup>。

### 1.1.2 嗜热菌的生境

自然界中,嗜热菌通常分布在地热显示区、海底火山口以及一些人工高温环境中。地热环境在地球上分布很广,主要处在陆地和海洋地质构造断裂带或者构造活跃区。大致可以分为三种类型<sup>[3-13]</sup>:

- (1) 酸性硫磺区。酸性硫磺区是嗜热菌主要的陆地生境,包括酸性土壤、酸性温泉、沸泥塘等。通常酸性硫磺区分布在火山活跃地带,海拔高于海平线,最高温度 100℃, pH 0-5, 盐度低,一般含盐量为 0.1%-0.5%。酸性硫磺区的化学组成因地而异,主要成分有水、甲烷、硫化氢、硫酸盐、二氧化碳、一氧化碳、硫、铁矿等。
- (2) 淡水温泉和中型、碱性的间歇喷泉。淡水温泉和中型、碱性的间歇喷泉是嗜热菌另一个主要的陆地生境,分布在火山活跃地带外围, pH 7-10, 盐度低,一般含盐量为 0.1%-0.5%,最高温度 100℃,主要成分有水、硅酸盐、碳酸盐、二氧化碳等。
- (3) 深海热液区。深海热液区是嗜热菌的主要海洋生境。深海热液区通常由地壳或火山形成。热液口温度可达 400℃,盐度高,一般含盐量为 3%。热液区高温、酸性、富含矿质、甲烷、硫化氢等。

### 1.1.3 嗜热菌的分类鉴定极其在生命起源中的地位

有关嗜热菌的最早报道是在 1879 年,米奎尔 (P. Miquel) 从法国塞纳河中分离到能在 70℃ 高温中生长的杆菌<sup>[14]</sup>。而第一个严格意义上的嗜热菌是美国人 Thomas Brock 于 1969 年从美国黄石国家公园分离出的水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)。从那以后,尤其是近三十年中,越来越多的高温菌被发现和描述。同时对嗜热菌的研究也更加的深入,研究的手段和研究的内容以及程度也越来越深入、越来越细微,呈现出往内在和本质方向发展的趋势。

嗜热菌的系统分类是 Woese 与他的同事们在 16S rRNA 寡核苷酸序列分析的基础上建立了嗜热菌的分类系统。他们根据热自养甲烷杆菌 (*Methanobacterium thermoautotrophiles*) 16S rRNA 序列分析结果,在分子水平上将原核生物分为真细菌 (Eubacteria) 和古细菌 (Archaeobacteria)<sup>[15]</sup>, 并进一步提出了趋向自然的生命三域进化系统: 古菌域 (domain archaea)、细菌域 (domain bacteria) 和

真核生物域(domain eucarya)<sup>[16]</sup>。此外, DNA G+C%含量测定、DNA-DNA (rDNA) 分子杂交、基因组分析、蛋白质分析、胞壁分析、膜脂分析、多胺分析等<sup>[17-27]</sup>, 也可以用于嗜热菌的分类鉴定。至今, 已有超过 70 多个属, 140 多种嗜热菌被分离和鉴定, 其中已有 17 种嗜热菌的基因组被测序, 包括古细菌域 13 种、细菌域 4 种。具体为: 矿泉古菌 4 种, 即 *Aeropyrum pernix*, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii* 和 *Pyrobaculum aerophilum*; 宽广古菌界 9 种, 即 *Archaeoglobus fulgidus*, *Nethanothermobacter thermotrophicus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanopyrus kandleri* AV19, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermoplasma acidophilum* 和 *Thermoplasma volcanium*; 嗜热细菌 4 种, 即 *Aquifex aeolicus*, *Thermotoga maritima*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* 和 *Thermus thermophilus*<sup>[28-29]</sup>。

目前已发现的嗜热菌具有以下三个特点: 1) 分类进化级位覆盖三个域; 2) 系统进化地位越低生长温度(最适或上限温度)越高, 如古菌的上限温度为 121℃, 细菌的上限温度为 90℃, 真菌的上限温度为 60-62℃; 3) 已发现的最适生长温度超过 80℃的嗜热菌都是严格厌氧的<sup>[2]</sup>。烟栖火叶菌(*Prolobus fumarii*) 适合生长温度超过 100℃, 最高生长温度可以达到 113℃。另外 2003 年, 研究人员在太平洋中脊(Juan de Fuca Ridge)的一个热液口分离获得一株古细菌可以在 121℃的条件下生长。这两者都是从海底火山口分离到的, 以氢为电子供体营化能自养生活的超嗜热菌。

在 16SrDNA 系统进化树上, 嗜热菌与超嗜热菌都处于系统进化树的基部, 并且分支较短, 说明其进化缓慢, 因此人们认为两者可能与原始生命非常接近, 并且认为生命起源于嗜热菌<sup>[2]</sup>(图 1, 图片引自: 和致中, 等; 高温菌生物学, 2001)。

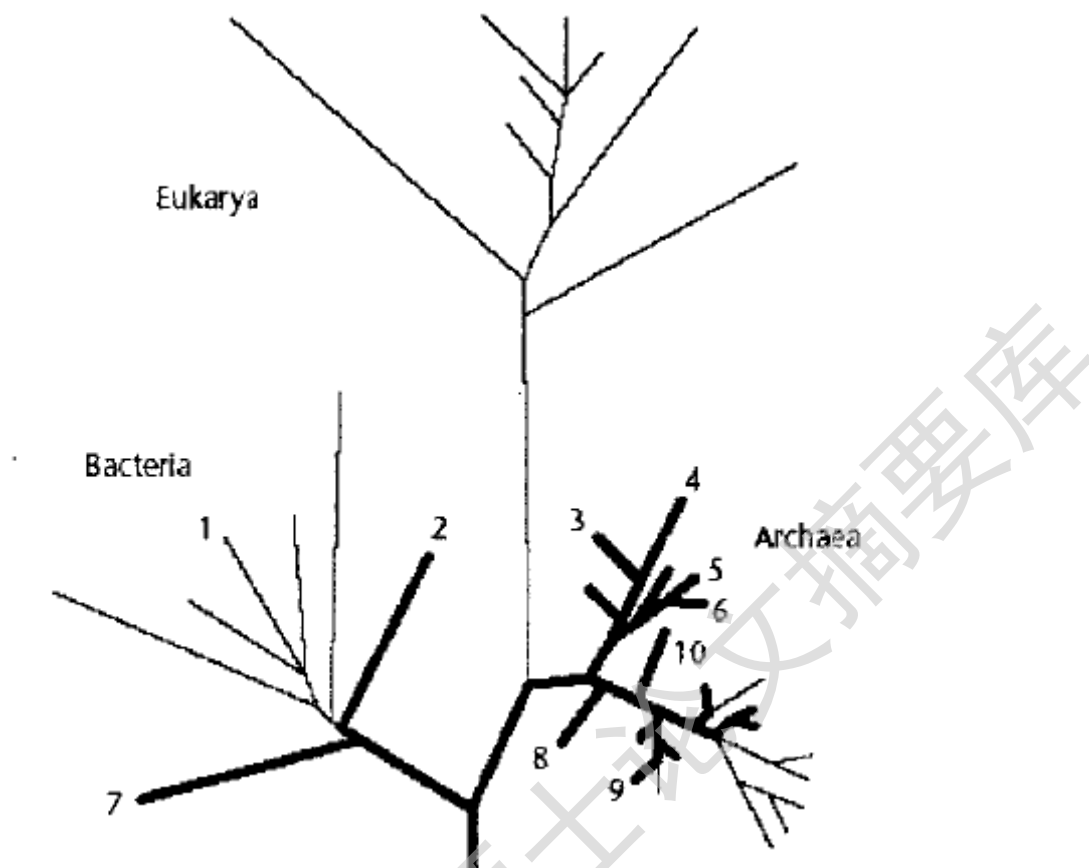


图 1. 生命三域的 16S rDNA 的系统进化树（粗体代表高温菌和超高温）。

图中数字分别为：1. *Thermoanaerobacter* spp.; 2. *Thermotoga* spp.; 3. *Desulfurococcus* spp.; 4. *Sulfolobus* spp.; 5. *Thermophilum* spp.; 6. *Thermoproteus* spp.; 7. *Aquifex* spp.; 8. *Methanopyrus* spp.; 9. *Methanococcus jannaschii*; 10. *Thermococcus* spp..

Fig 1. Phylogenetic tree of three domains of life

### 1.1.4嗜热菌的耐热机制及嗜热菌的应用

生长环境的特殊性，使得嗜热菌具有独特的耐热机制，目前，嗜热菌的耐热机制主要表现在以下几方面：1) DNA 结构的稳定性。主要体现在 G+C 含量高，碱基堆积力高，DNA 与组蛋白以及核小体形成聚合体等方面<sup>[30-32]</sup>；2) RNA 的稳定性。主要因为嗜热菌中的 tRNA 的 G+C 含量高，故其热稳定性高，而且其周转率比常温菌高，这就有助于一些重要酶的合成。细胞内多聚胺含量高，这就提高了核糖体和 rRNA 的稳定性，而核糖体的热稳定性是嗜热菌生长上限温度的决定性因子。3) 膜脂。在嗜热菌细胞膜的脂双层分子中有很多结构特殊的复合类脂，

嗜热菌细胞膜统称通过调节磷脂组分来维持膜的液晶态,从而增强嗜热菌对高温的耐受程度<sup>[33]</sup>。此外,膜脂在维持膜的流动性,跨膜运输等方面起重要的作用。

4) 蛋白质的稳定性。这种稳定性主要是由于蛋白质的一级结构决定的。蛋白质的热稳定性是嗜热菌在高温环境中维持正常生理活动的另一关键因素<sup>[34-35]</sup>。

嗜热菌不仅具有重要的科学价值,而且还具有巨大的应用价值。主要体现在以下四个方面:

(1) 热稳定酶的应用。由嗜热菌产生的 DNA 聚合酶、淀粉酶、纤维素酶等嗜热酶具有耐热性和高效性等特点,已在食品、化工、制药、生物工程等反面得到了广泛的应用。如 *Thermus aquaticus* 中分离的 DNA 聚合酶已经被广泛应用于聚合酶链式反应中的 DNA 扩增<sup>[36]</sup>。

(2) 嗜热菌在冶金中的应用。生物浸出是以利用硫化矿物为能量来源的微生物来对矿石进行作用,使金属离子进入溶液的过程,其特点流程过、成本低、环境好和低污染等,目前该技术已成为世界矿石加工的前沿技术。嗜热菌对某些矿物有特殊的浸溶能力,对某些金属具坚强的耐受能力,利用这类微生物,为矿产资源的开发利用提供了良好的前景。今年来,随着各种技术不断发展,用于纯化各种稀有金属如金、铀、镍、锰、铅、银、锆等的微生物提取试验工厂已经在美国、加拿大、澳大利亚等国建立起来。

(3) 嗜热菌在生物能源开发中的应用。用可再生的生物物质生产乙醇是解决未来能源问题的方法之一。目前,已知的嗜热和极端嗜热厌氧菌绝大部分都能用于发酵糖类产生乙醇。而且,嗜热厌氧菌具有可发酵的基质范围广;加热成本低;高温有利于挥发性乙醇的回收等特点。此外,有嗜热和极端嗜热厌氧菌具有产甲烷、产氢、产电的能力<sup>[37]</sup>。

(4) 嗜热菌在环境保护中应用。嗜热和极端嗜热厌氧菌可以用废水废料厌氧处理,可提高生物降解速度,进而提到处理效率,同时可以消灭污水污物中的病原微生物。如嗜热菌能降解多环芳烃,随着温度的提高,此类污染物的疏水性下界,物质扩散速度增加,污染物处理效率得到提高<sup>[38]</sup>。

随着新的嗜热菌的分离、鉴定以及嗜热菌中热稳定酶的开发和利用,以及不段涌现的新技术的应用,嗜热微生物的开发和利用将呈现更加广阔的前景。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库